

KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE- SHRNUTÍ

Ivana Vítková

Masarykova univerzita

Katedra laboratorních metod



Klinická mikrobiologie

- Zajišťuje **diagnostiku** infekčních onemocnění vyvolaných bakteriemi, viry, parazity a mykotickými agens
- Stanovuje **citlivost/rezistenci** mikrobiálních agens k antimikrobiálním látkám
- Ve spolupráci s klinickými lékaři poskytuje **konzultace** mikrobiologického nálezu a antimikrobiální terapie

- Vyšetření biologického materiálu
- Stanovení pravděpodobného původce infekce
- Stanovení citlivosti k antibiotikům



- Správný výsledek mikrobiologického vyšetření začíná **správným odběrem** biologického materiálu a jeho rychlým **transportem** do mikrobiologické laboratoře

Vyšetření biologického materiálu

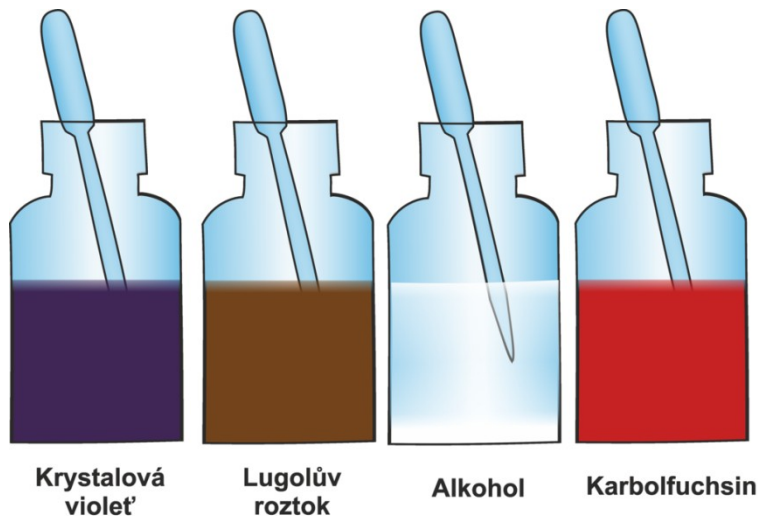
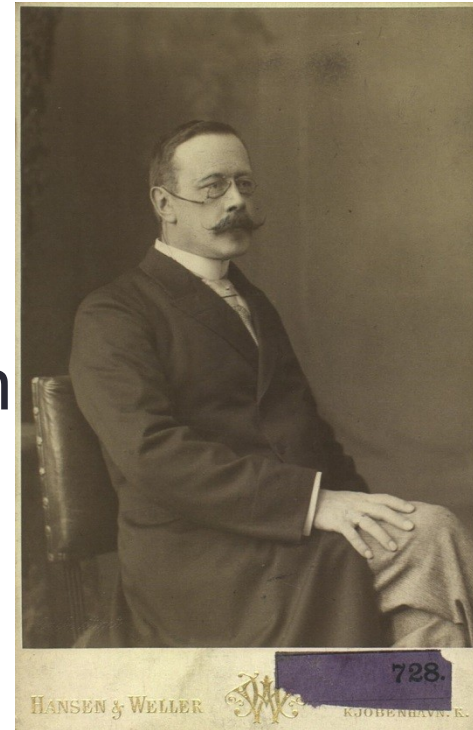
- Zhotovení mikroskopického preparátu
- Kultivace
- Průkaz antigenů
- Průkaz metabolitů (*Helicobacter pylorii* -ureáza)
- Průkaz nukleových kyselin (PCR)
- Průkaz protilátek (nepřímý průkaz)

Mikroskopie

- ❖ Nativní preparát
 - Trichomonas vaginalis
- ❖ Barvený preparát
 - Barvení dle Grama
 - Barvení dle Giemsy
 - Barvení dle Ziehl- Nielsena
 - Barvení spor
 - Barvení pouzder
 - Fluorescenční barvení

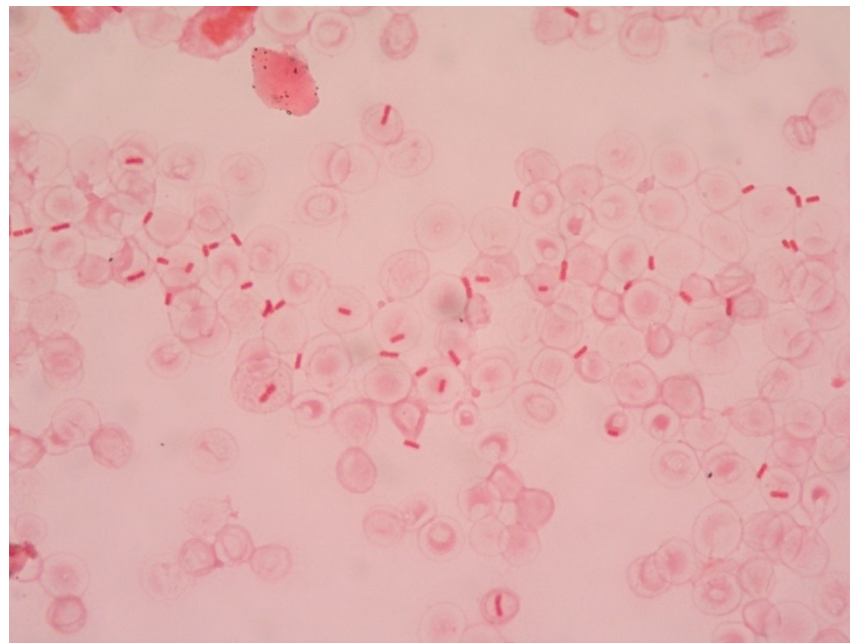
Barvení podle Grama

- Hans Christian Joachim Gram, 1884
- Dělí bakterie do dvou základních skupin
 - Grampozitivní G +, modrofialové
 - Gramnegativní G -, růžovočervené



Barvení podle Grama- význam

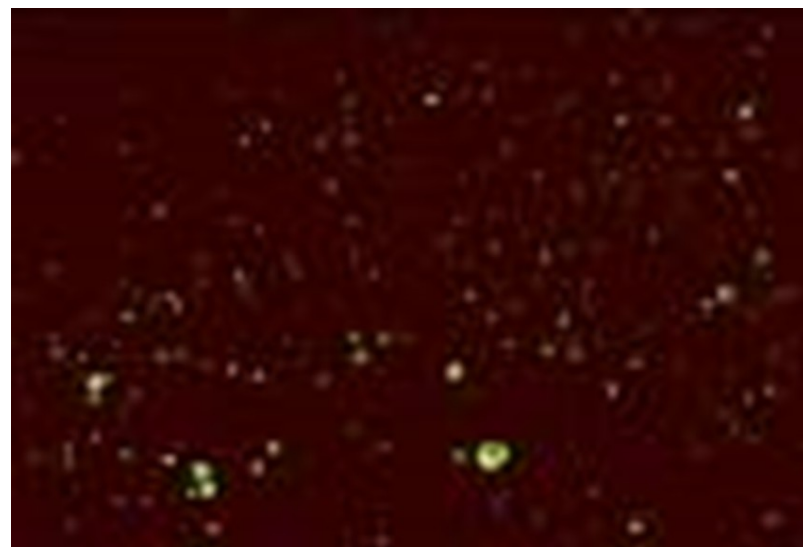
- Diagnostické barvení – základ klasifikace a taxonomie bakterií
- Možnost okamžité a racionální antibiotické terapie (mikroskopie pozitivních hemokultur, sputa)



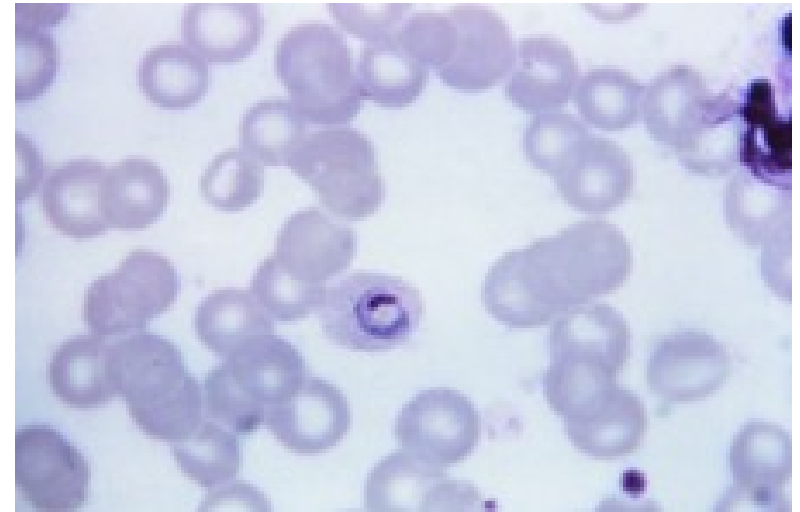
Fluorescenční barvení

Pomocí fluoreskujícího barviva

- Imunofluorescence
 - Na hledaný antigen se naváže protilátka označená fluoreskujícím barvivem
- Pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu



- Mikroskopie- parazitologické vyšetření



Kultivační průkaz

- Základní mikrobiologický postup
- Cílem je:
 - ✓ Získat mikroba z klinického materiálu v čisté kultuře
 - ✓ Identifikovat ho
 - ✓ Určit citlivost k antibiotikům

- Kultivační půdy (tuhé, tekuté, diagnostické, selektivní, selektivně diagnostické...)
- Očkování biologického materiálu
- Diagnostická antibiotika
- Kalibrované kličky

Kultivační půdy

- ❖ Tekuté: masopeptonový bujon
- ❖ Tuhé:
 - Krevní agar
 - Čokoládový agar
 - Levinthalův agar
 - Mac Conkey agar (Endova půda)
 - Sabouraudův agar

Podmínky kultivace

- Dostatečná vlhkost prostředí
- Optimální teplota - 37 °C (4 °C, 40 °C)
- Optimální pH půdy – 7,2 – 7,4
- Dostatek vhodných živin
- Vhodné plynné prostředí (aerobní, anaerobní, mikoraerofilní kultivace)

Anaerostat



Identifikace bakterií

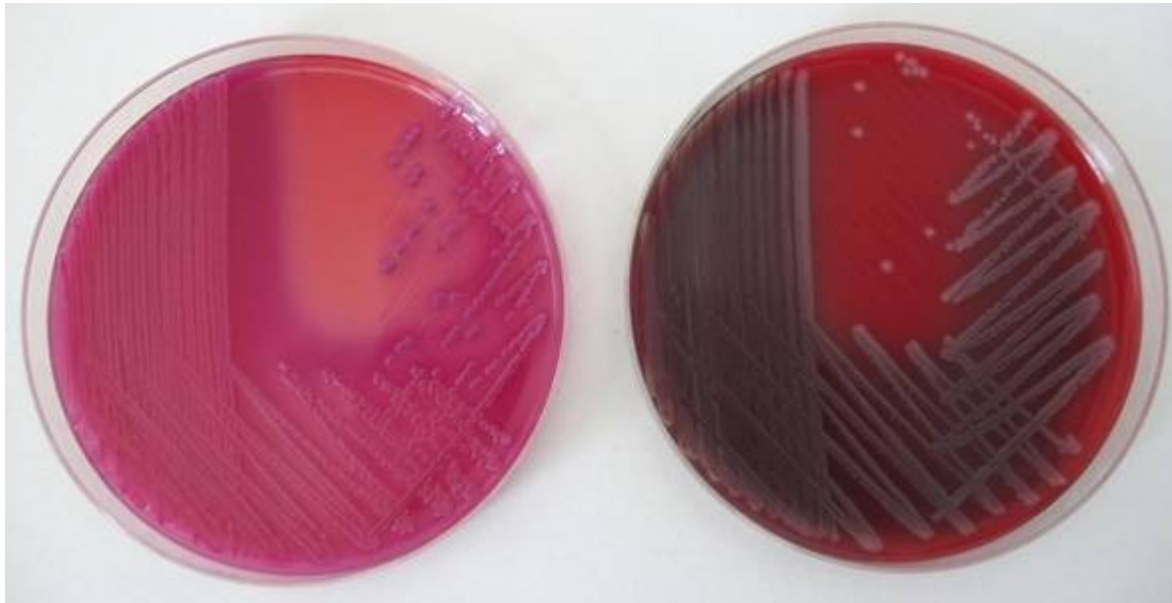
- Podle morfologie
- Podle růstových vlastností
- Podle biochemických vlastností
 - Selektivní půdy
 - Komerční diagnostické soupravy
- Podle antigenní struktury
 - Latexová aglutinace
- Hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF)

Identifikace bakterií- morfologie a růst

- Typický růst některých bakterií
- Morfologie kolonií
- Hemolýza



MacConkey agar a krevní agar nárůst *E.coli*



Identifikace bakterií- MALDI

- Výhody hmotnostní spektrometrie (rychlost)
- Úskalí dokonalé identifikace

Anaerobní kultivace:

Nález: *Finegoldia magna*

Stanovení kvalitativní citlivosti na antibiotika:

Augmentin, Unasyn.....C

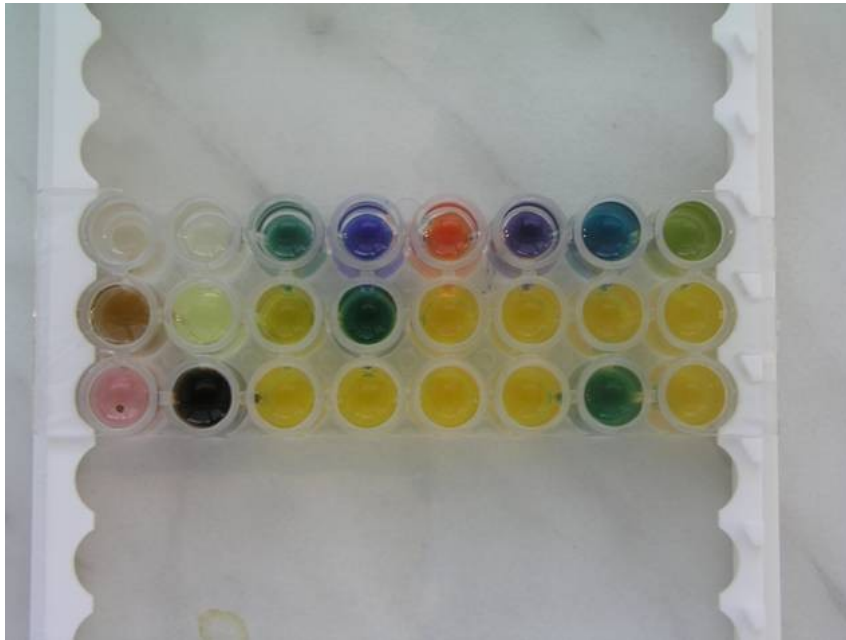
metronidazol.....C

clindamycin.....C

F.magna je grampozitivní anaerobní kok.

Kódy citlivosti: C=citlivý, R=rezistentní, X=výsledek sdělíme na požádání

Identifikace bakterií- biochemie

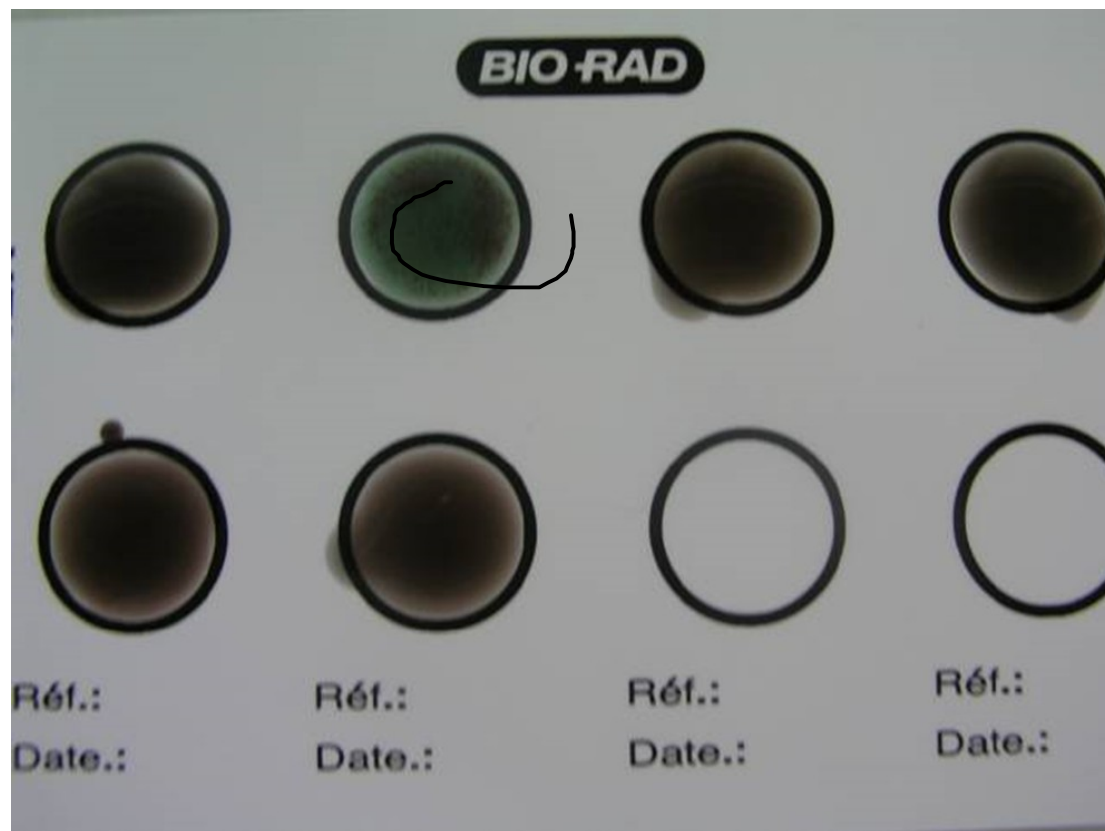


- Většinou nahrazeno metodou MALDI TOF
- V některých případech ale nutné (E.coli x Shigella)

Identifikace bakterií- průkaz antigenů

- Latexová aglutinace
- Rychlá vyšetřovací metoda

1



Identifikace - průkaz antigenů

- Mykologie- stanovení antigenů hub pomocí ELISA
- Galaktomanan (aspergilový antigen)
- Glukan (panfungální antigen- vysoká negativní prediktivní hodnota)

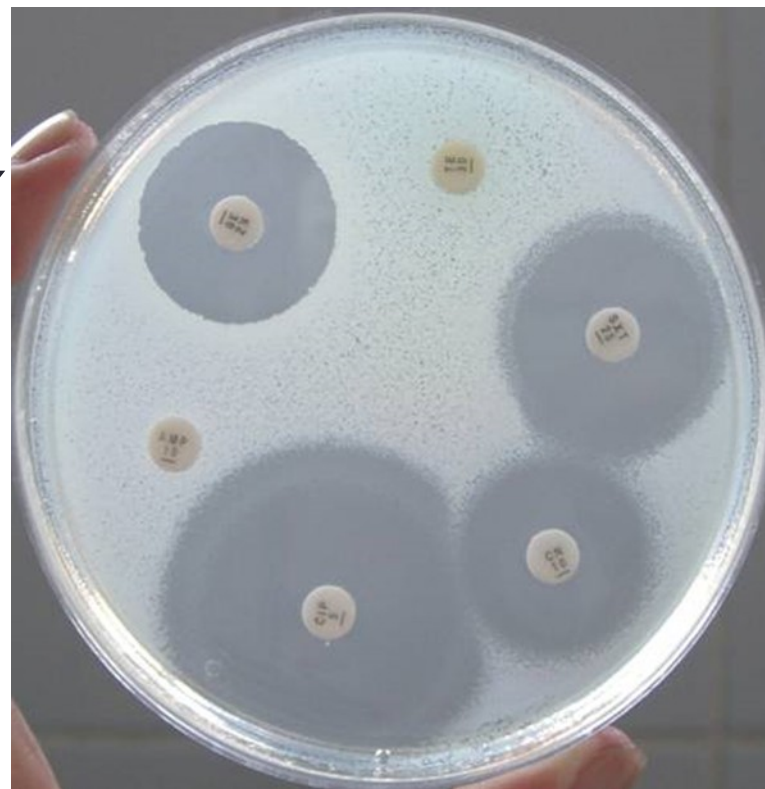
Kultivace- hodnocení

- Nález **primárního patogena**- většinou jednoznačná situace (*Neisseria gonorrhoeae*)
- Nález **oportunního patogena**- nutné informace o pacientovi a komunikace s klinikem!!
častější situace

- Stanovení citlivosti agens k antibiotikům
- Disková difúzní metoda
- Stanovení hodnot MIC antibiotika vůči danému mikroorganismu
- Semikvantitativní metody (mykoplazmata, ureaplazmata)

Stanovení citlivosti k antibiotikům

- Disková difúzní metoda
 - Difuze antibiotik z disků do půdy a potlačení růstu bakterií
 - Srovnání se standardy
 - Vyhodnocení a zařazení do kategorií C/I/R

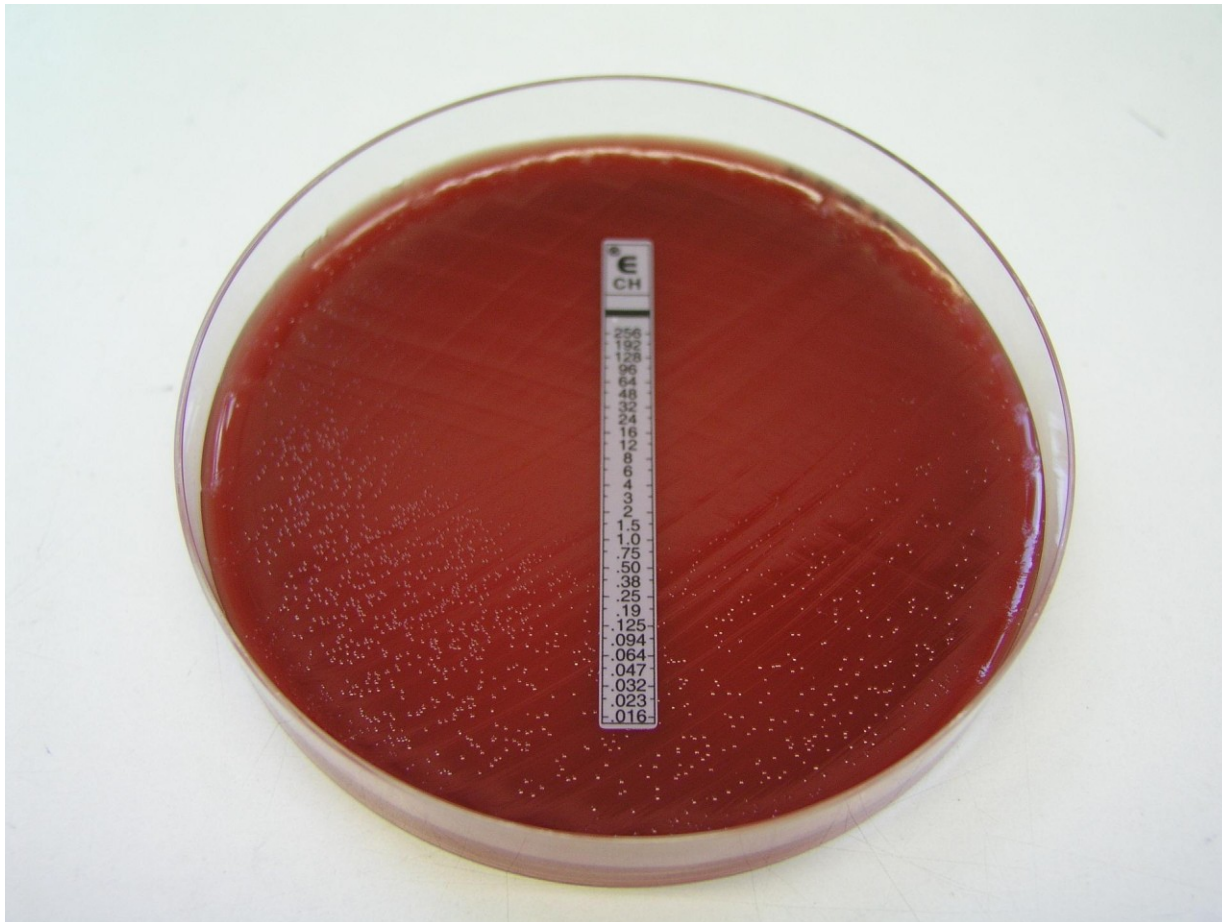


Stanovení citlivosti k antibiotikům

- Diluční testy
 - Stanovení koncentrace antibiotika, která potlačuje růst mikroba (MIC)
 - Srovnání se standardy
 - Vyhodnocení a zařazení do kategorií C/I/R



Stanovení MIC– E-test



Diagnostika virových infekcí

1. Přímá- , mikroskopie, tkáňové kultury, průkaz antigenu, nebo nukleové kyseliny viru
2. Nepřímá- průkaz protilátek

Přímý průkaz viru

- Mikroskopický průkaz- elektronový mikroskop
- Izolace viru na tkáňových kulturách- pěstování viru na kulturách buněk (opičí ledviny)- cytopatický efekt

Průkaz nukleových kyselin viru

- polymerázová řetězová reakce
- přímý průkaz NK virů (bakterií, kvasinek, parazitů)
- různé modifikace
- výhody: vysoká specifita, rychlost, ATB nejsou kontraindikací vyšetření
- nevýhody: vysoká cena, přístrojové vybavení, riziko kontaminace

Průkaz protilátek

- Průkaz odezvy makroorganismu na infekční agens
- Používané také u obtížně kultivovatelných bakterie (chlamydie, borélie)

Přehled serologických metod

1. Precipitace
2. Aglutinace
3. Komplement fixační reakce (KFR)
4. Neutralizace
5. Reakce se značenými složkami:
 - imunofluorescence
 - enzymová immunoanalýza
 - Western blot (imunoblot)

- **Klinická** mikrobiologie- poskytuje servis vyšetření klinickým lékařům v úzké spolupráci s nimi!!
- Stanovuje různými metodami původce daného onemocnění
- Konzultace mikrobiologického nálezu
- Konzultace antibiotické terapie
- Rychlost, kvalita

- **Vzájemná komunikace!!**

Kasuistika

- Pacient VCH, 1960
- Přijatý v březnu 2015 pro bolesti zad, crp 275, leukocytóza, febrílie
- Paraplegik po autonehodě, kovový materiál na rozhraní Th a L páteře

- Bolesti zad:
 - Ranná infekce
 - Spondylodiscitida
 - Infekce ledvin
 - Infekce v dutině břišní (pankreas)
 - Infekce v malé pánvi (gynekologické infekce)

- Paraplegik po autonehodě, kovový materiál na rozhraní Th a L páteře
- Odběr biologického materiálu:
 - Hemokultivace
 - Moč



- Diagnostikována spondylodiscitida v oblasti Th páteře
- Hemokultura
- Empirická antibiotická terapie

- Původce?

Staphylococcus aureus představuje nejčastější mikrobiální agens vyvolávající spondylodiscitidu. Lze jej předpokládat zejména u spondylodiscitid anamnesticky spojených se stafylokokovou infekční endokarditidou, u pacientů s předchozí katérovou infekcí krevního řečiště, nebo infekcí kůže a měkkých tkání v anamnéze. Rizikovou skupinu pro spondylodiscitidu vyvolanou *Staphylococcus aureus* představují také nitrožilní narkomani.

U pacientů s touto předpokládanou etiologií je pro empirickou terapii doporučený **oxacilin v kombinaci s gentamicinem**.

- Anamnéza:

- Infekční fokus (kariézní chrup, abscesy, IE...)
- Předchozí infekce (infekce spojené se zavedením CVK, uroinfekce, jiné infekce spojené a bakterémií...)

- Anamnéza:
 - 11-12/2014 hospitalizován pro absces v ledvině
 - Nefrektomie
 - Revize pro krvácení do lůžka po ledvině
 - 11/2014 pozitivní hemokultura s nálezem *Klebsiella pneumoniae* s ESBL produkcí

- Vstupně nasazený potencovaný aminopenicilin (Augmentin)
- Pro vysokou suspekci na klebsielovou etiologii spondylodiscitidy doporučena terapie meropenemem
- Monoterapie- solitární ledvina s horší funkcí, kreatinin 370 $\mu\text{mol/l}$, alergie na ciprofloxacin

- Kultivace: půdy, inokulum, antibiotické disky
- Atmosféra, doba kultivace
- Hodnocení: identifikace mikroorganismu a stanovení citlivosti

- Pozitivní hemokultura s nálezem *Klebsiella pneumoniae* s ESBL produkcí
- Ponechána terapie meropenemem + přidáný amikacin v redukováných dávkách
- Pokles hodnot crp i leu, stabilizace stavu

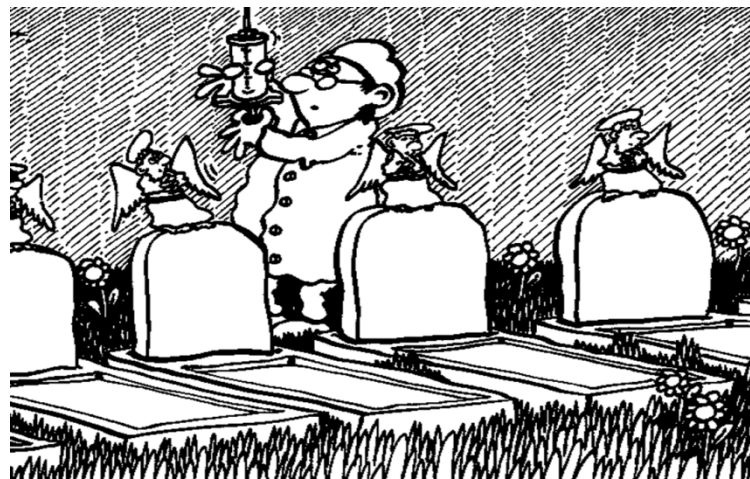
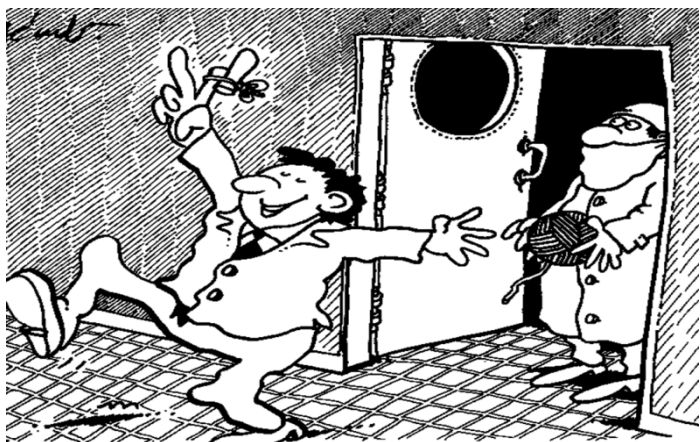


- Délka terapie?
- Perorální pokračování terapie?
- P.o. tetracyklin?
- OPAT?- zatím v ČR - výjimečně

Tetracyclines	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Doxycycline	-	-		-	-	1. Tigecycline has poor activity against <i>Morganella</i> spp., <i>Proteus</i> spp. and <i>Providencia</i> spp. 2. For tigecycline broth microdilution MIC determination, the medium must be prepared in a special way. A. Zone diameter breakpoints validated for <i>E. coli</i> only. For other Enterobacteriaceae
Minocycline	-	-		-	-	
Tetracycline	-	-		-	-	
Tigecycline ¹	1 ²	2 ²	15	18 ^A	15 ^A	

- Opakovaná antibiotická konzultace po hospitalizaci v jiném ZZ
 - Pacient s crp opět 270, zhoršení stavu
 - Klindamicin v terapii osteomyelitidy v kombinaci s amikacinem
 - Po CDI (*Clostridium difficile*)
 - *Kl.pneumoniae* ESBL ze sputa
 - MRSA z hrudních drénů
 - Polyrezistentní *Pseudomonas aeruginosa* z moči
- Původce spondylodicitidy není *S.aureus*, tedy zbytečný klindamycin
- Riziko clostridiové kolitidy
- Amikacin není vhodný v monoterapii plicních infekcí
- Amikacin není vhodný v monoterapii stafylokokových infekcí

- Opět doporučený do terapie meropenem
- Výhled pacienta?



Děkuji za pozornost